DOI:10.11931/guihaia.gxzw201810032

[1]海南西海岸真红树内生细菌多样性及其延缓衰老活性研究

李蜜，高程海，姜舒，韦娟，刘思萍，戴恩枝，易湘茜*

（广西中医药大学 海洋药物研究院/药学院/广西中药药效研究重点实验室，南宁 530200）

摘要：设计 9 种分离培养基，采用稀释涂布法从 14 份真红树植物的 46 份组织样品中分离纯化内生细菌。基于菌株形态学特征和 16S rRNA 基因序列确定分离菌株的种属，并分析其物种多样性，采用秀丽隐杆线虫模型筛选菌株延缓衰老活性。结果表明：通过基因序列去重复后从 46 份真红树植物组织样品中获得 32 株海洋细菌，基于菌株 16S rRNA 基因序列信息分析，覆盖 12 科 17 属，其中芽孢杆菌属（*Bacillus*）为优势菌属，并获得 1 株疑似橙单胞菌属（*Aurantimonas*）新种，16S rRNA 基因序列相似性低于 97%。经过秀丽隐杆线虫粗筛发现 3 株海洋细菌具有显著延缓线虫衰老的活性（$P<0.05$）。研究结果表明海南西海岸真红树内生细菌具有物种多样性，部分菌株具有延缓线虫衰老活性。

关键词：真红树植物，内生细菌，多样性，延缓衰老活性

中图分类号：R946，Q939.1　　　　**文献标识码：**A

Study on diversity and anti-aging activity of endophytic bacteria from true mangrove plants collected from the west coast of Hainan

LI Mi, GAO Chenghai, JIANG Shu, WEI Juan, LIU Siping, DAI Enzhi, YI Xiangxi *

（*Institutes of Marine Drugs/Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica/Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine*, Nanning 530200, China）

Abstract: The bacteria were isolated and purified from forty-six tissues fourteen true mangrove plants used nine kinds of isolation medium by dilution coating method. The strains diversity and genera were analyzed by bacteria morphological characteristics and 16S rRNA gene sequences. The Anti-aging activities of the bacteria were tested by *Caenorhabditis elegans* screening models. The results showed that 32 marine bacteria were obtained by the 46 true mangrove plants tissue. The 32 bacteria to comparison of 16S rRNA gene sequences which could be classified into 7 families and 11 genera. The dominant genus were *Bacillus*. The 16S rRNA gene sequence similarities between 1 strains and the related species were all less than 97% have been already proved to be novel species of the genera *Aurantimonas*. The three cultured marine bacteria could delay *Caenorhabditis elegans* developing and have dominant anti-aging activity（$P<0.05$）. The true mangrove plants collected from the west coast of Hainan have high species diversity and a part of rich in anti-aging activity.

Key words: true mangrove plants, endophytic actinobacteria, species diversity, anti-aging activity

全世界红树林植物共有 24 科 30 属 83 种主要分布在美洲、非洲和东南亚的热带和亚热

基金项目：国家自然科学基金（41566004）；广西中医药大学岐黄工程高层次人才团队培育项目（2018006）；广西中医药大学 2017 年引进博士科研启动基金项目（2017BS039）；广西中药药效研究重点实验室资助项目（17-259-20） [Supported by the National Natural Science Foundation of China (41566004); Development Program of High-level Talent Team under Qihuang Project of Guangxi University of Chinese Medicine (2018006); The Research Launching Fund Project from Guangxi University of Chinese Medicine Introduced the Doctoral in 2017 (2017BS039); Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica (17-259-20)]。

作者简介： 李蜜（1995-），女，广西柳州人，硕士研究生，主要从事海洋中药物质基础与产品开发研究，（E-mail）18878552446@163.com。

***通信作者：**易湘茜，博士，副教授，硕士生导师，主要从事海洋生物资源应用研究，（E-mail）42672960@qq.com。

带经济不发达地区(Holguin et al., 2001)。中国红树林主要分布于福建，海南，广东和广西等沿海地区，其中真红树植物有 11 科 24 种（廖宝文等，2014）。林鹏等（1997）认为真红树植物是指专一地生长于潮间带的木本植物。红树林生长于缺氧、高养分和高盐等特殊环境，可产生大量结构丰富和活性显著的次级代谢产物（沈明曦等，2011；袁献温等，2009）。而生活在其组织内部的微生物，受特殊环境的影响易产生遗传变异从而使物种多样性丰富，代谢产物药理活性独特。近年，从红树林植物中发现大量储藏在植物内部的微生物，主要活性有抗菌（李家怡等，2017）、抗病毒和细胞毒（李菲等，2016）等。李家怡等（2017）从广西山口红树林自然保护区采集的红海榄中分离得到 17 株内生细菌，其中 3 株对副溶血弧菌具有较强的抑菌活性。刘月廉等（2010）从秋茄、白骨壤、无瓣海桑三种真红树植物的 540 块组织中分离到内生细菌 90 株，其中菌株 AC2 对致皮肤病真菌具有较强的拮抗性。李菲等（2016）采用稀释涂布法，从无瓣海桑中分离得到 38 株内生细菌，其中 5 株具有较强的细胞毒活性。从广西北海金海湾红树植物秋茄中得到 50 株内生细菌，并筛选出 37 株细菌对甘蔗黑穗霉菌有抑制作用（李菲等，2017）。由此可见，真红树细菌资源丰富，且药理活性独特，其多样性值得我们深入研究。

当代社会，人类生活水平与上个世纪相比较显著提高，但人口老龄化趋势日趋显著（曾尔亢等，2012）。人口老龄化的加剧使得抗衰老不容忽视同时也是急需解决的问题。红树林生态资源丰富，其中滋养着多样性丰富的微生物，从红树林微生物中发现延缓衰老药物是我们研究的关键问题。红树林位于海陆交界处，兼具有海洋和陆地的特征又存在区别。据资料显示，真红树内生微生物次级代谢产物的化学和药理活性研究报道很多，但关于微生物代谢产物粗提物延缓衰老的药理研究相对偏少。国内外利用秀丽隐杆线虫模型主要研究中药提取物和保健产品的抗衰老，海洋微生物发酵产物对线虫延缓衰老的研究鲜有报道。陈亮稳等（2013）发现蜜环菌菌索多糖能显著延长秀丽隐杆线虫的生存期，并对其生殖力无损害。Petrascheck et al.（2007）利用秀丽隐杆线虫筛选抗衰老药物，共筛选了 8.8 万个化合物，发现 115 个化合物能延长线虫的寿命。本课题组（李蜜等，2018）利用秀丽隐杆线虫模型发现 2 株具有延缓衰老的海洋放线菌，能有效延迟线虫的死亡时间。

海南西海岸位于北部湾湾区，其红树林物种多样性丰富，并且滋生丰富的微生物资源。因此发掘其中真红树内生细菌多样性差异对海洋细菌资源的开发利用具有重要意义。本实验以海洋真红树植物为研究对象，采用稀释涂布法对其展开内生细菌多样性研究；利用秀丽隐杆线虫衰老模型对其代谢产物粗提物进行延缓衰老活性筛选；为挖掘更多潜在新物种以及真红树细菌潜在的药理活性，为研究新型抗衰老药物提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

真红树植物样品：14 份真红树植物样品于 2017 年 7 月分别采集于海南西海岸区域，具体样品信息如表 1，根部位 5 份样品，茎 14 份，叶子 13 份，花 2 份和果 12 份，共 46 份真红树植物组织。其中，H1-H7 真红树植物其经纬度为 109º59′37″E 、19º55′07″N，H8-H14 经纬度为 109º31′50″E 、19º51′26″N。样品用无菌水冲洗其表面以去除表面杂质，立即装入自封采样袋，置于采样冰盒中 24 h 内送回实验室，置-20 ℃冰箱保存备用。野生型秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）、OP50 尿嘧啶缺陷型大肠杆菌（*Escherichia coli*）均由广西科学院汪斌博士提供。

表 1 样品采集信息

Table 1 Information of collected samples

样品编号 Number of samples	采集植物 Plant names	植物部位 Plant tissue
H1	桐花树 *Aegiceras corniculatum*	茎，叶，果 Stem, leaf and fruit
H2	红海榄 *Rhizophora stylosa*	花，茎，叶，果，根 Blossom, stem, leaf, fruit and root
H3	榄李 *Lumnitzera racemosa*	茎，叶，果 Stem, leaf and fruit
H4	白骨壤 *Avicennia marina*	花，茎，叶，果 Blossom, stem, leaf and fruit
H5	桐花树 *Aegiceras corniculatum*	茎，叶，果，根 Stem, leaf, fruit and root
H6	白骨壤 *Avicennia marina*	茎，叶，果 Stem, leaf and fruit
H7	红海榄 *Rhizophora stylosa*	茎，叶，果，根 Stem, leaf, fruit and root
H8	白骨壤 *Avicennia marina*	茎，叶 Stem and leaf
H9	木果楝 *Xylocarpus granatum*	茎，叶，果，根 Stem, leaf, fruit and root
H10	瓶花木 *Scyphiphora hydrophyllacea*	茎，果 Stem and fruit
H11	桐花树 *Aegiceras corniculatum*	茎，叶，果 Stem, leaf and fruit
H12	红树 *Rhizophora apiculata*	茎，叶，果，根 Stem, leaf, fruit and root
H13	木榄 *Bruguiera gymnorrhiza*	茎，叶，果 Stem, leaf and fruit
H14	卤蕨 *Acrostichum aureum*	茎，叶 Stem and leaf

1.2 方法

1.2.1 分离培养基（表 2）

分离培养基参考李飞娜（2017）等设计如下 9 种，AGG：改良的高氏培养基、M4：海藻糖-天冬酰胺培养基；M5：海藻糖-脯氨酸培养基；M7：改良 ISP5 培养基；M9：精氨酸-天冬酰胺培养基；M10：改良淀粉-水解酪素培养基；P7：酪氨酸-天冬酰胺培养基；P3：燕麦培养基；M11：棉籽糖-组氨酸培养基。详细配方信息如表 2 所示，每种培养基加入 1 L 海水、10 mL 的复合盐溶液和 20 g 的琼脂，调节 pH7.2，均于 121 ℃下灭菌 20 min（复合盐溶液：KNO_3 1.0 g，NaCl 0.5 g，$MgSO_4$•7H_2O 0.5 g，K_2HPO_4 0.5 g，NH_4NO_3 0.1 g，$FeSO_4$ 0.01 g，$MnCl_2$•H_2O 0.001 g，$ZnSO_4$•7H_2O 0.001 g 和去离子水 10 mL）。待培养基温度降至 50 ℃时加入抑制剂重铬酸钾使其终浓度为 25 mg•L^{-1}，混匀。

纯化及保藏培养基：改良 ISP2 固体培养基，酵母提取物 2.0 g，麦芽提取物 2.0 g，葡萄糖 2.0 g，琼脂 20.0 g 和海水 1 000 mL。

发酵培养基：ISP2 液体培养基。

表 2 分离培养基信息

Table 2 Information of isolation medium

培养基 Medium	培养基配方 Media components（L•g^{-1}）
AGG	淀粉，葡萄糖，甘油 Starch soluble 10 g, glucose anhydrous 1 g, glycerol 5 mL
M4	L-天冬酰胺，海藻糖 L-Asparagine 1 g, trehalose 5 g
M5	海藻糖，脯氨酸 Trehalose 5 g, proline 1 g
M7	酵母粉，L-天冬酰胺，甘油 Yeast extract 5 g, L-Asparagine 1 g, glycerol 10 mL
M9	精氨酸，L-天冬酰胺，甘油 Arginine 1 g, L-Asparagine 1 g, glycero l6 mL
M10	葡萄糖，酸水解酪素 Glucose anhydrous 10 g, gasein hydrolysate 0.5 g
P7	L-络氨酸，L-天冬酰胺，甘油 L-Tyrosine 0.5 g, L-Asparagine 1 g, glycerol 15 mL
P3	燕麦粉琼脂 Oatemeal agar 20 g
M11	棉籽糖，L-组氨酸 Raffinose pentahydrate 5 g, L-Histidine 1 g

1.2.2 红树植物样品的处理

参考李家怡等（2017）方法，对红树植物样品进行表面除杂和消毒，5%次氯酸钠溶液浸泡 8 min，无菌水冲洗至没有残留；75%的酒精溶液浸泡 5 min，无菌水冲洗至无酒精。取大约 2 g 的新鲜样品进行研磨，吸取 2 mL 无菌水与样品混匀，该浓度液作为样品原液，再用无菌水依次稀释到 10^{-3} 和 10^{-4} 组织悬液，置于 4 ℃冰箱暂存。

1.2.3 菌株的分离纯化及保藏

取 10^{-3} 和 10^{-4} 组织悬液 0.2 mL，分别涂布于 9 种不同成分的分离培养基中，置于 28 ℃恒温培养箱培养 14~30 d；通过形态观察，挑选表面光滑的单菌落在 ISP2 培养基上进行三区划线纯化，如有杂菌则进行二次纯化或多次纯化，直至得到单一纯净的菌落，同时记录菌落数及菌落的形态特征。纯化好的菌株制成 20%(V/V)甘油管保藏于-80 ℃。

1.2.4 PCR 扩增和系统发育树分析

采用 Chelex-100 Resin 法（周双清等，2010）提取基因组 DNA；并参照 Walsh et al.（1991）的方法进行 PCR 梯度扩增。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测，Bio-RAD 凝胶成像仪成像观察电泳结果。凝胶成像仪检验条带合格后委托上海美吉生物医药技术有限公司广州分公

司进行测序。

测序结果经 DNA Star 软件整理，利用数据库 EzBioCloud（https://www.ezbiocloud.net/）（KIM et al., 2009）进行在线比对；对 16S rRNA 基因序列进行相似性比对搜索，从中选取相似性较高且是有效描述的典型菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象。

1.3 延缓衰老活性实验

1.3.1　红树林细菌粗提物的制备

参考覃媚等（2016）的方法，将 32 株对数生长期的菌株接种于 200 mL 液体培养基中发酵 7 d，离心收集发酵液，发酵液用乙酸乙酯萃取，取乙酸乙酯层浓缩备用；收集粗提物，置于干燥器中低温保存。

1.3.2 NGM（nematode growth medium）培养基配制

参考 Brenner（1974）的方法 3 g NaCl，2.5 g 蛋白胨，17 g 琼脂，1 mol•L^{-1} K_2HPO_4-KH_2PO_4 Buffer (pH=6.0) 25 mL，975 mL 蒸馏水，灭菌。灭菌后加入抽滤除菌的 5 mg•mL^{-1} 胆固醇溶液 1 mL，1 mol•L^{-1} $MgSO_4$ 1 mL，1 mol•L^{-1} 的 $CaCl_2$ 1 mL。

1.3.3 秀丽隐杆线虫延缓衰老活性测试方法

真红树内生细菌代谢产物粗提物样品分两批次进行线虫寿命实验，第一批次总共采集得到 11 个样品的寿命数据，样品详情如表 3 所示，第二批次总共采集得到 8 个样品的寿命数据，具体数据如表 4 所示。

实验步骤：用 M9 缓冲液将虫体洗净离心弃上清液，以 1：3 的比例加入裂解液（1 mL 5 mol•L^{-1} 的 NaOH 和 0.5 mL 5%的 NaClO 混匀使用），震荡离心后，分别加入 20 μL 大肠杆菌发酵液，30 μL 线虫 pellet、150 μL M9 Buffer 于 96 孔板的各个孔中，设置阴性对照。 置于 20 ℃ 生化培养箱中培养 48 h 后可得 L4 期线虫。将培养好的 L4 期线虫挑至加有药液（药液浓度 500 μg•mL^{-1} 每次加 50 μL）的 NGM 培养基上进行培养，每组 2 板，每板 20 条，此时培养天数记为 0 d。此后，隔天对培养基的线虫进行计数，每天观察并记录线虫生存、死亡及剔除的数量，将线虫每 2 d 转移至新的培养皿，直至线虫全部死亡。得出平均寿命和最大寿命值。

1.4 统计分析

所有数据采用 SPSS Statistics 17.0 进行统计分析，并用 Excel 2013 软件做表、绘图，通过 DNA Star 软件进行序列整理。

2　结果与分析

2.1 红树植物内生细菌多样性分析

根据菌落特征进行初步排重后，选择 58 株菌进行 16S rRNA 基因扩增和序列分析，16S rRNA 基因序列比对结果表明 32 株为细菌分布于 4 个纲 10 个目 12 个科 17 个属，其物种组成多样性分布如表 3 所示。32 株红树林植物内生细菌在 17 个属的多样性分布如图 1 所示，其中橙单胞菌属（*Aurantimonas*）、短波单胞菌属（*Brevundimonas*）、甲基杆菌属（*Methylobacterium*）、鞘氨醇单胞菌属（*Sphingomonas*）、无色杆菌属（*Achromobacter*）、柠檬酸杆菌属（*Citrobacter*）、*Kushneria* 菌属、*Salinicola* 菌属、沙雷氏菌属（*Serratia*）、根瘤菌属（*Rhizobium*）、弧菌属（*Vibrio*）、寡养单胞菌属（*Stenotrophomonas*）分别含 1 个种，不动杆菌属（*Acinetobacter*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）分别含 2 种，泛菌属（*Pantoea*）为 3 种，芽孢杆菌属（*Bacillus*）为优势菌属含 11 个种占分离细菌的 34.37%。从分离得到的海洋细菌中发现 1 株细菌的全长 16S rRNA 基因序列与其最近缘的典型菌株序列相似性低于 97%，基于系统发育分析认为全长序列相似性低于 98.65%的菌株代表潜在新属或新种（Kim et al.,2014）。IMDGX 6574 与有效发表菌株 *Aurantimonas coralicida* DSM $(14790)^T$ 的最高相似性为 94.65%，为潜在的新种或新属。

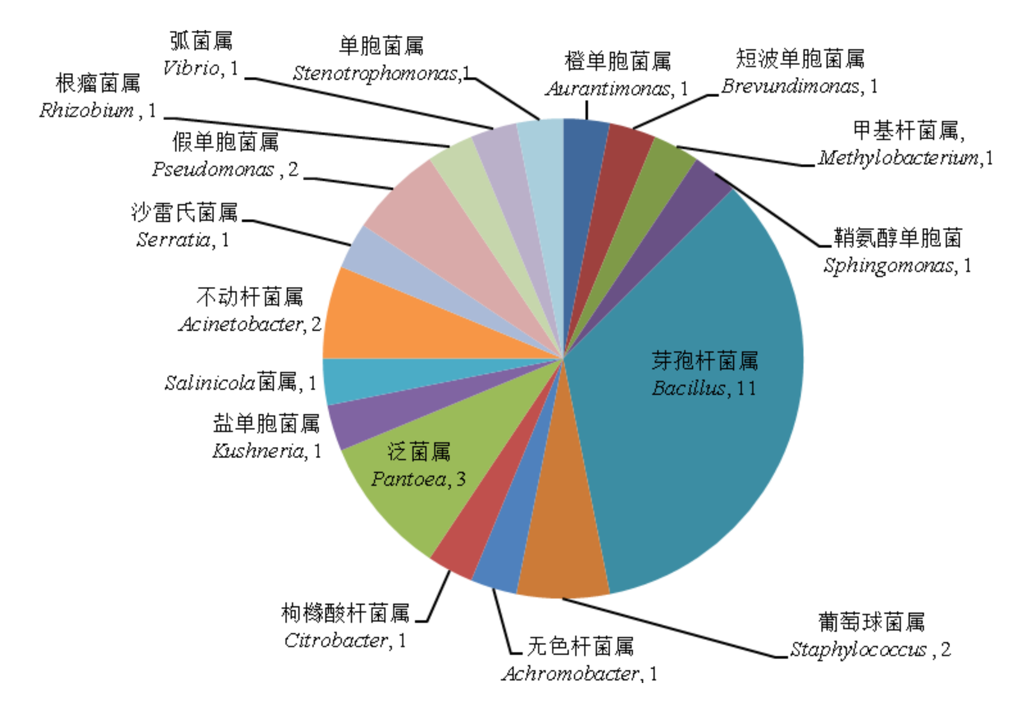


图 1 32 株真红树植物内生细菌在 17 个属的多样性分布

Fig. 1 Diversity of thirty-two strains as endophytic bacteria from the true mangrove plants in the seventeen genus

表 3 32 株可培养内生细菌的物种组成

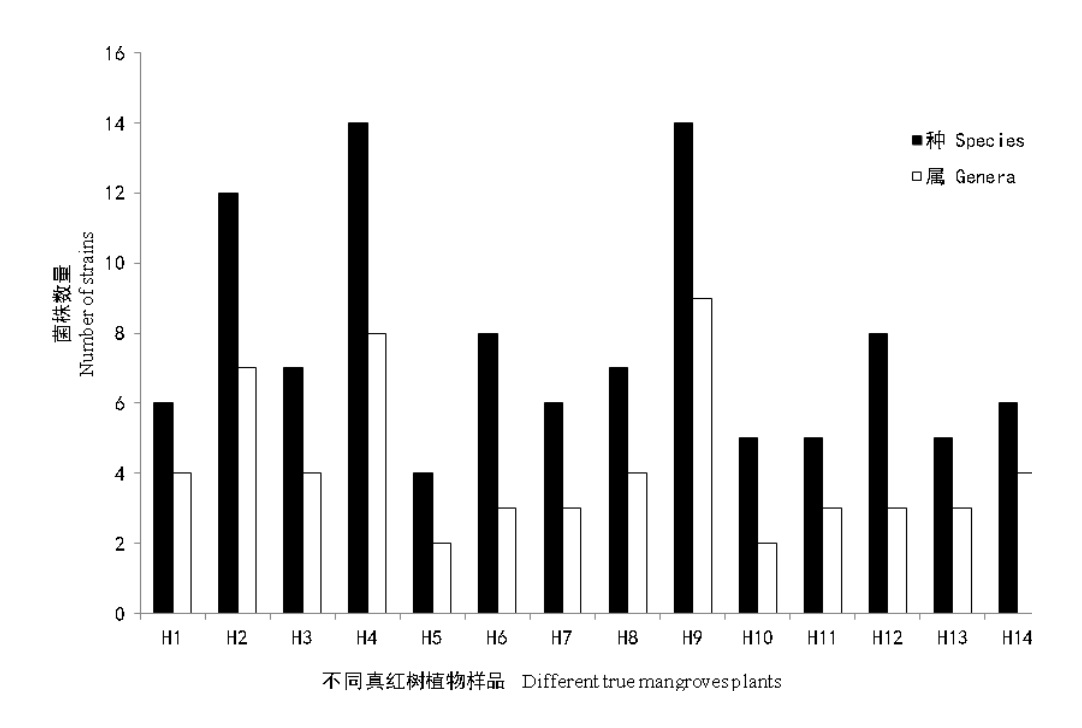
Table 3 Compositions of culturable 32 endophytic bacteria

菌株编号 Strain code	相近种 Origin	16S rRNA 基因序列相似性 16S rRNA sequence identity(%)
IMDGX 6464	*Achromobacter denitrificans*	99.87
IMDGX 6256	*Acinetobacter radioresistens*	99.74
IMDGX 6121-1	*Acinetobacter soli*	98.20
IMDGX 6574	*Aurantimonas coralicida*	94.65
IMDGX 6233	*Bacillus altitudinis*	99.10
IMDGX 6152	*Bacillus aryabhattai*	99.77
IMDGX 6218	*Bacillus cereus*	100
IMDGX 6106	*Bacillus flexus*	99.08
IMDGX 6102	*Bacillus humi*	98.05
IMDGX 6369	*Bacillus paralicheniformis*	99.49
IMDGX 6227	*Bacillus qingshengii*	99.34
IMDGX 6107	*Bacillus siamensis*	99.87
IMDGX 6295	*Bacillus tequilensis*	99.87
IMDGX 6283	*Bacillus vanillea*	99.06
IMDGX 6395	*Bacillus vietnamensis*	98.70

IMDGX 6470	*Brevundimonas vesicularis*	99.36
IMDGX 6341	*Citrobacter europaeus*	99.01
IMDGX 6374	*Kushneria avicenniae*	98.70
IMDGX 6355	*Pantoea anthophila*	99.31
IMDGX 6483	*Pantoea dispersa*	100
IMDGX 6407	*Pantoea eucrina*	99.08
IMDGX 6476	*Pseudomonas hunanensis*	99.61
IMDGX 6466	*Pseudomonas psychrotolerans*	98.81
IMDGX 6461	*Rhizobium pusense*	99.74
IMDGX 6377	*Salinicola acroporae*	98.80
IMDGX 6462	*Sphingomonas desiccabilis*	99.35
IMDGX 6291	*Staphylococcus sciuri*	99.87
IMDGX 6289	*Staphylococcus warneri*	99.61
IMDGX 6198	*Stenotrophomonas rhizophila*	98.32
IMDGX 6472	*Vibrio furnissii*	99.22
IMDGX 6085	*Serratia marcescens subsp. sakuensis*	99.87
IMDGX 6604	*Methylobacterium podarium*	99.61

2.2 32 株内生细菌在植物样品、植物组织及培养基中的分布

32 株真红树内生细菌在 14 份植物样品、5 种植物组织及 9 种分离培养基中的分布情况如图 2、图 3 和图 4 所示。其中，图 2 样品 H4（1 号采样点的白骨壤）和 H9（2 号采样点木果楝）分离得到的菌株数量最多，其次是样品 H2 红海榄，分离得到 12 株细菌。从不同组织部位分离得到的细菌种属多样性与数量结果如（图 3）所示，如从叶子获得的菌株数量最多（22 株），相应地其种属多样性也最丰富（12 个属），根中分离得到的菌株数量最少（6 株），相应地其种属多样性也较少（3 个属）。根据 9 种分离培养基的分离效果可知，图 4 中 M7 培养基（改良 ISP5 培养基）分离得到的菌株数量和多样性均最多，其主要营养成分为酵母粉与 L-天冬酰胺，M10 培养基（改良淀粉-水解酪素培养基）分离得到菌株数量和多样性较高，M9 培养基（精氨酸-天冬酰胺培养基）分离得到菌株数量和多样性均最少。因此，M7（改良 ISP5 培养基）与 M10（改良淀粉-水解酪素培养基）培养基可为今后分离纯化细菌工作提供培养基成分参考。



注：**H1-H14**. 具体信息见表 1。

Note: **H1-H14**. Information in the Table 1.

图 2 不同真红树植物样品中分离得到的内生细菌

Fig. 2 Endophytic bacteria isolated from different true mangrove plants

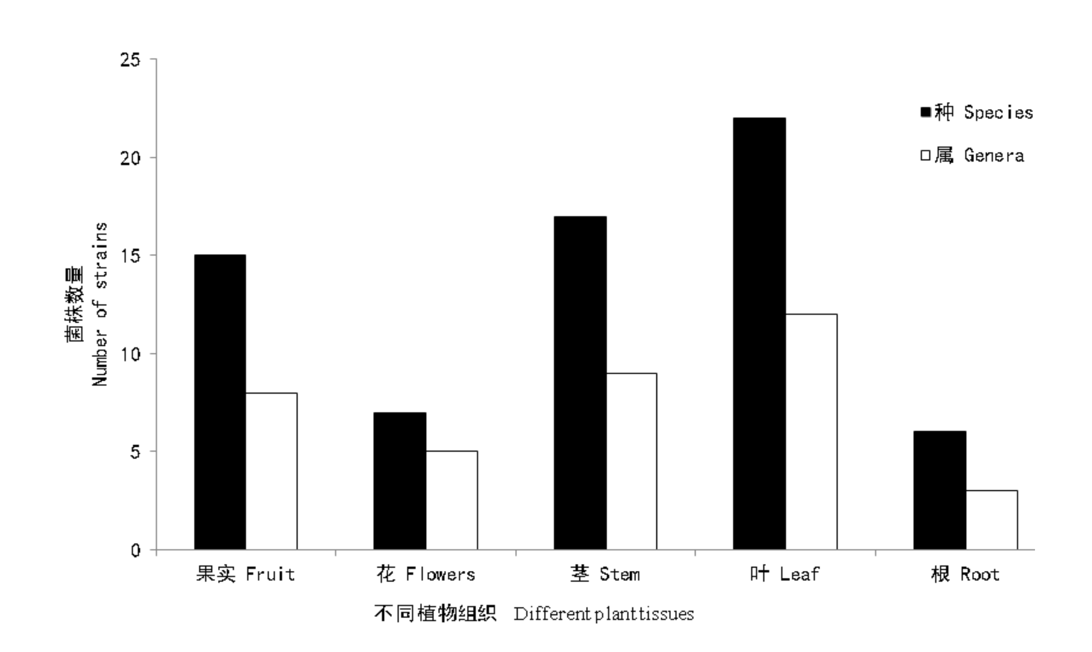
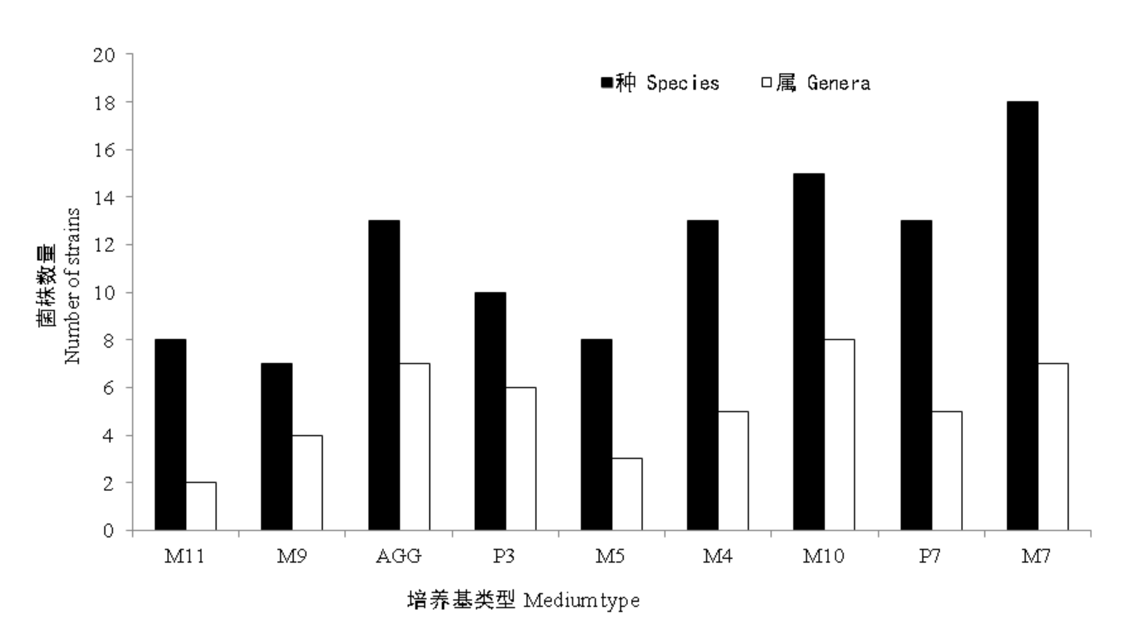


图 3 不同植物组织分离得到的内生细菌

Fig. 3 Endophytic bacteria isolated from different plant tissues



注：培养基具体信息见表 2。

Note: Information of isolation medium in the Table 2.

图 4 不同培养基分离得到的内生细菌

Fig. 4 Endophytic bacteria isolated from different media

2.3 真红树植物内生细菌发酵产物延缓衰老活性分析

内生细菌的延缓衰老活性数据，采用 SPSS statistics21.0 软件进行分析，采用方差分析进行两两比较。由表 4 第一批研究结果可知编号 IMDGX 6198 寡养单胞菌属的 *Stenotrophomonas rhizophila* 与空白对照相比 $P<0.01$，差异极显著，并且具有统计学意义。表 5 所示，第二批次样品中编号 IMDGX 6121-1 不动杆菌属的 *Acinetobacter soli* 与对照组比较 $P<0.01$，IMDGX 6355 泛菌属的 *Pantoea anthophila* 与对照组比较 $P<0.05$ 具有显著差异，能显著延长线虫寿命。

研究结果分析显示 IMDGX 6198， IMDGX 6355 和 IMDGX 6121-1，3 株真红树内生细菌能显著延缓线虫衰老，分别与相对应批次的空白组比较平均寿命可分别达到 19.62±1.04 d，19.63±6.72 d 和 22.70±0.94 d，最大寿命可达到 21.68 d，21.37 d 和 24.57 d。据 Huang et al.（2004）研究可知寿命长短是衰老过程研究中的一个主要依据，线虫的衰老过程伴随着生理功能的衰减。因此，研究线虫的寿命可评价微生物代谢产物的延缓衰老活性。

表 4 第一批内生细菌代谢产物对秀丽隐杆线虫生存寿命的影响

Table 4 The first *Caenorhabditis elegans* survival lifetime of the extracts from endophytic bacteria

菌株编号 Strain code	平均寿命 Average lifetime（d）	最大寿命 Maximum lifetime（d）
1%DMSO	18.65±0.90	20.41
IMDGX 6464	14.60±0.62	15.81
IMDGX 6233	15.35±0.72	16.76
IMDGX 6106	16.10±0.77	17.62
IMDGX 6227	17.15±0.93	18.99
IMDGX 6295	17.30±0.78	18.82
IMDGX 6395	15.90±0.71	17.29

IMDGX 6374	16.10±0.70	17.47
IMDGX 6198	19.62±1.04**	21.68
IMDGX 6085	18.20±0.75	19.67
IMDGX 6107	17.86±0.90	19.63
IMDGX 6483	17.70±0.52	18.73

注：数据为平均值±标准差，*n*=40。*与空白对照组比较，差异显著（*P*<0.05）；**与空白对照组比较，差异极显著（*P*<0.01）。下同。

Note：Data= $\bar{x}\pm s$, *n*=40.*refers to significant difference with the blank control group（*P*<0.05）; **refers to extremely significant difference with the blank control group（*P*<0.01）. The same below.

表 5 第二批内生细菌代谢产物对秀丽隐杆线虫生存寿命的影响

Table 5 The second *Caenorhabditis elegans* survival lifetime of the extracts from endophytic bacteria

菌株编号 Strain code	平均寿命（d） Average lifetime（d）	最大寿命（d） Maximum lifetime（d）
1%DMSO	16.9±0.91	19.42
IMDGX 6152	15.00±0.80	16.60
IMDGX 6355	19.63±0.87*	21.37
IMDGX 6466	17.43±0.77	18.97
IMDGX 6604	17.61±0.91	19.44
IMDGX 6218	16.45±0.66	17.74
IMDGX 6369	16.26±0.94	18.13
IMDGX 6121-1	22.70±0.94**	24.57
IMDGX 6407	13.33±0.91	15.14

3 讨论与结论

随着普通环境下筛选新化合物的几率逐渐下降，人们开始把注意力转向了特殊生境的微生物资源（李文均等，2003）。海南西海岸红树林资源丰富生长环境独特，同时也为其内生菌提供了特殊的生态环境。为丰富海南西海岸真红树内生细菌的多样性及生物活性，本研究选择 14 份真红树植物的 46 份组织样品，利用 9 种不同营养成分的分离培养基分离纯化其中的内生细菌，共分离培养内生细菌 32 株，隶属于 12 科 17 属，其中 13 株芽孢杆菌（*Bacillus*）（占 40.62%），为优势菌群。可见，芽孢杆菌在真红树内生微生物中占统治地位，这与李菲等（2017）研究结果相同。本研究从真红树植物的 13 份叶子中分离到 22 株内生细菌数量最多，其次从 14 份茎中分离到 17 株，12 份果实样品中得到 15 株，2 份花中得到 7 株和 5 份根部位样品得到 6 株，叶子中分离得到的细菌种类最多，其次是茎和果实，花与根部位最少，此研究结果与其它学者相比较存在差异（魏玉珍等，2010；李家怡等，2017；陈振明等，2006）。推测原因可能是采样地点和季节，采集样品的老嫩程度和采集样品部位的数量，样品处理方式和外部环境所致。因此，海南西海岸同一种真红树内生细菌的分布及其生物学特性是否具有组织特异性, 还需进一步深入探索。

利用秀丽隐杆线虫模型筛选内生细菌的延缓衰老活性。检测结果显示，3 株真红树内生细菌 *Stenotrophomonas rhizophila*，*Pantoea anthophila* 和 *Acinetobacter soli* 皆具有显著延缓线虫衰老的活性，分别隶属寡养单胞菌属（*Stenotrophomonas*），泛菌属（*Pantoea*）和不动杆菌属（*Acinetobacter*）。活性菌株 *Stenotrophomonas rhizophila* 曾被报道从石油污染的土壤上分离得到(Kumar et al., 2015)。*Acinetobacter soli* 能高效降解食物中的聚山梨酸酯(Nguyen., 2018），该属细菌可分泌表面活性剂，能有效降解石油烃以降低石油烃的生物毒性（刘玉华

等，2016）。由此可见，筛选到的两株活性菌株具有开发成为药物、保健食品及化工产品的潜力。在本次研究中，菌株 *Stenotrophomonas rhizophila* 从红海榄根（H2），白骨壤茎（H4），红树根（H12），木榄果实（H13）中均分离得到，*Pantoea anthophila* 于木果楝叶子（H9）中分离得到，*Acinetobacter soli* 可从木果楝茎（H9）以及瓶花木果实（H10）中分离得到。由此可见，同一海域不同采集地点和不用植物组织均可分离到相同的菌株。

就新颖性而言，从海南西海岸桐花树叶子中发现 1 株 *Aurantimonas sp.*的潜在新种，其与已发表菌株 *Aurantimonas coralicida* DSM 14790^{T}(ATXK01000033)的 16S rRNA 基因序列相似性低于 97.00%。因此，下一步将对潜在新菌开展多相分类鉴定及对 3 株具有延缓衰老活性的菌株进行发酵条件的优化，并分析其发酵代谢产物的化学组成及其抗衰老机理，以期为海洋延缓衰老药物的开发与利用奠定基础。

参考文献：

BRENNER S, 1974. The genetics of *Ceanorhabditis elegans* [J]. Genetics, 77(1): 71-94.

CHEN ZM, HE JJ, HE H, et al., 2006. Isolation and screening of endophytic antifungal bactetia mangroves[J]. Microbiology, 33(3):18-23. [陈振明，何进坚，何红，等，2006. 红树林内生细菌的分离及拮抗菌筛选[J]. 微生物学通报, 33(3):18-23.]

HUANG C, XIONG C, KORNFRLD K., 2004. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 101(21):8084-8089.

HOLGUIN G, VAZQUEZ P, BASHAN Y, 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview[J]. Biol Fert Soils, 33 (4) : 265-278.

KIM KH, ROH SW, CHANG HW, et al., 2009. *Nitratireductor basaltis sp. nov.* isolated from black beach sand[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 59(1):135-8.

KUMAR SVP, MANJUNATHA BK., 2015. Studies on hydrocarbon degradation by the bacterial isolate Stenotrophomonas rhizophila (PM-1) from oil spilled regions of Western Ghats of Karnataka[J]. Sci Technol Art Res J, 4(3):139.

KIM M, OH HS, PARK SC, et al., 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 64: 346-351.

LI Y, 2012. Isolation and screening anti-viral actinomycetes from three mangrove[D]. Haikou：Hainan University.［李逾, 2012. 三种红树植物共附生放线菌的分离及其抗病毒活性菌株的筛选[D]. 海口：海南大学.］

LI FN, PAN Z, TUO L, et al., 2017. Studies on the diversity and novelty of endophytic actinobacteria isolated from mangrove plants collected in Macao [J]. Chin J Antibiot, 42(4):284-293.[李飞娜，潘臻，庹利,等, 2017. 澳门红树林植物内生放线菌多样性及新颖性研究[J]. 中国抗生素杂志, 42(4):284-293.]

LIN P, 1997. Mangroves ecologie from China[M]. Beijing: Science Pres.[林鹏, 1997. 中国红树林生态系[M]. 北京：科学出版社]

LI M, YI X X, YANG CN, et al., 2018. Study on diversity and Anti-aging activity of endophytic actinobacteria from associated mangrove plants collected from the west coast of Hainan[J].Guihaia:1-11.[李蜜，易湘茜，杨彩妮,等，2018.海南西海岸红树林伴生植物内生放线菌多样性及其延缓衰老活性初筛[J/OL].广西植物:1-11. http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20180802.1511.002.html]

LI JY, ZHOU WH, LI F, et al., 2017. Diversity of cultivated marine bacteria and antibacterial activity of endophytic bacterial in *Rhizophora stylosa*[J]. Guihaia, 37(3): 308-314. [李家怡, 周文红, 李菲, 等, 2017. 红海榄内生细菌多样性及其抑制鱼类致病菌活性研究[J]. 广西植物, 37(3) : 308－314.]

LI F, GAO CH, ZHU LB, et al., 2016. Diversity and cytotoxic activity of endophytic bacteria isolated from *Sonneratia apetala* of Maowei Sea[J]. Acta Microbiol Sin, 56(4): 689-697. [李菲, 高程海, 竺利波, 等, 2016. 茅尾海无瓣海桑内生细菌多样性及其细胞毒活性[J]. 微生物学报, 56(4):689-697.]

LI F, GAO CH, YU L, et al., 2017. Diversity of endophytic bacteria isolated from *Kandelia candel* and its *in-vitro* activity against Ustilago scitaminea Sydow[J]. Chin J Antibiot, 42(4):318-320. [李菲, 高程海, 余炼, 等, 2017. 秋茄内生细菌多样性及抑制甘蔗黑穗霉菌活性研究[J]. 中国抗生素杂志, 42(4):318-320.]

LI WJ, XU P, XU LH, et al., 2003. Actinomycetes resources form the extreme environment. [J]. Microbiology, 30(4): 125−127. [李文均, 徐平, 徐丽华, 等, 2003. 极端环境中的放线菌资源[J]. 微生物学通报, 30(4): 125−127.]

LIU YH, WANG H, HU XK, 2016. Recent advances in the biodegradation of hydrocarbons by *Acinetobacter* species[J]. Microbiology, 43(7):1579-1589. [刘玉华, 王慧, 胡晓珂, 2016. 不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌降解石油烃的研究进展[J]. 微生物学通报, 43(7):1579-1589.]

LIAO BW, ZHANG QM, 2014. Area, distribution and species composition of mangroves in China[J]. Wetl Sci, 12(4):436-440. [廖宝文, 张乔民, 2014. 中国红树林的分布、面积和树种组成[J]. 湿地科学, 12(4):436-440.]

NGUYEN NT, 2018. Acinetobacter soli SP2 capable of high-efficiency degradation of food emulsifier polysorbate 80[J]. Curr Microbiol, 75(7):896-900.

PETRASCHECK M, YE X, BUCK LB, 2007. An antidepressant that extends lifespan in adult *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 450(7169): 553-556.

QIN M, YU QW, ZHU LB, et al., 2016. Diversity of epiphytic bacteria of three species of gracilaria and their bacteriostatic activities[J]. J S Agric, 47(11):1966-1973. [覃媚, 于清武, 竺利波, 等, 2016. 三种江蓠共附生细菌多样性及抑菌活性分析[J]. 南方农业学报, 47(11), 1966-1973.]

SHEN MX, CHEN G, DUAN L, et al., 2011. Cyclo-dipeptide metabolites from marine bacterium *Pantoea agglomerans*[J]. J Shenyang Pharm Univ, 28(5):350-354. [沈明曦, 陈刚, 田黎, 等, 2011. 海洋细菌成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)中环二肽类代谢产物的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 28(5):350-354.]

WEI YZ, ZHANG YQ, ZHAO LL, et al., 2010. Isolation, screening and preliminary identification of endophytic actinobacteria from mangroves at Shankou of Guangxi Province[J]. Microbiology, 37(6):823-828. [魏玉珍, 张玉琴, 赵莉莉, 等, 2010. 广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定[J]. 微生物学通报, 37(6):823-828.]

WALSH PS, METZGER DA, HIGUCHI R, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. Biotechniques, 10(4):506-513.

YUAN XW, YANG RL, 2009. Isolation and identification of one marine actinomycete strain exhibiting antitumor activity[J]. Microbiology, 36(1):78-83. [袁献温, 杨瑞丽, 2009. 一株具有抗肿瘤活性的海洋放线菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报，36(1)：78-83.]

YAN DM, WANG W, LI M, et al., 2018. Diversity of rhizospheric bacteria and its inhibition activity from *Sonneratia apetala* in Maowei Sea[J]. J S Agric, 49（6）：1095-1101. [颜栋美, 王伟, 李蜜, 等, 2018. 茅尾

海无瓣海桑根际土壤细菌多样性及抑菌活性分析[J]. 南方农业学报, 49（6）：1095-1101.]

ZENG EK, SUN YH, DUAN L, et al., 2012. Aging of Chinese population and science of aging [J]. Chin J Soc Med, 29(6): 388-389. [曾尔亢, 孙煜昊, 段凌, 等, 2012. 我国人口老龄化与衰老科学[J]. 中国社会医学杂志，29(6)：388-389.]

ZHOU SQ, HUANG XL, HUANG DY, et al., 2010. A rapid method for extracting DNA from a ctinomycetes by chelex-100 [J]. Biotechnol Bull, (2): 123-125. [周双清，黄小龙，黄东益，等，2010. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. 生物技术通报，(2)：123-125.]